



Attorney's Docket No. 11141-003001 / AP01P005WOU5
1644
1/17

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Lars E. French et al.
Serial No. : 09/419,262
Filed : October 12, 1999
Title : METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING DISEASES
ASSOCIATED WITH INCREASED FAS-LIGAND TITERS

Art Unit : 1644
Examiner : Mary B. Tung

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TECH CENTER 1600/2900
JAN 14 2002

RECEIVED

TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

In accordance with the provisions of 35 U.S.C. §119, applicants hereby claim priority of German Patent Application No. 19900503.6, filed January 8, 1999. A certified copy of the application is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050, referencing Attorney Docket No. 11141-003001.

Respectfully submitted,

Date: December 6, 2001

Jack Brennan
Jack Brennan
Reg. No. 47,443

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, Massachusetts 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906

20349830.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

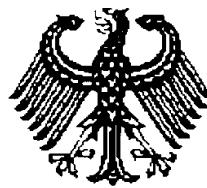
I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231

Date of Deposit

Signature

Darlene J. Morin
Typed or Printed Name of Person Signing Certificate

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



RECEIVED
JAN 14 2001
TECH CENTER 1600 2900

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 00 503.6

Anmeldetag: 08. Januar 1999

Anmelder/Inhaber: Apotech Research and Development Ltd., Genf/CH

Erstanmelder: Apotech S. A., Genf/CH

Bezeichnung: Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen mit erhöhten extrazellulären FasL-Titern, Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle derselben, Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung obiger Krankheiten mit gesteigerter Wirksamkeit

IPC: A 61 K 39/395

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoiß

Titel

Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen mit erhöhten extrazellulären FasL-Titern, Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle derselben, Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung obiger Krankheiten mit gesteigerter Wirksamkeit

SAMSON & PARTNER

PATENTANWÄLTE · EUROPEAN PATENT ATTORNEYS · EUROPEAN TRADE MARK ATTORNEYS

UNSER ZEICHEN/OUR REF
A1494-006-DEP00Sk
vS/27/kk

DATUM/DATE

8. Januar 1999

Anmelderin:

Apotech S.A.

Case 256

CH-1211 Genf/Schweiz

5

Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen mit erhöhten extrazellulären FasL-Titern, Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle derselben, Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung obiger Krankheiten mit gesteigerter Wirksamkeit

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Zusammensetzungen zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von humanen oder tierischen Zuständen, Erkrankungen oder Störungen mit pathophysiologisch erhöhten extrazellulären FasL-Titern, Verfahren zur prophylaktischen in vitro Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle einer Zusammensetzung für deren spätere Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen, pathophysiologischen Zustände bzw. Störungen sowie Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels mit gesteigerter pharmazeutischer Wirksamkeit zur Behandlung oben genannter Erkrankungen Störungen oder pathophysiologischer Zustände.

Fas - mangelhaft (zu -)



Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase ist eine im einzelnen fein differenzierte Kontrolle der Zellproliferation erforderlich. Die Kontrolle der Zellproliferation in lebenden Organismen gelingt u.a. durch den

Mechanismus des programmierten Zelltods (Apoptose). Aus der Literatur sind zahlreiche Signaltransduktionswege bekannt, die schließlich zum programmierten Zelltod führen. Hierbei spielt die Interaktion von extrazellulären Liganden, z.B. dem Fas-Liganden (FasL), mit diversen Zelloberflächenrezeptoren, z.B. dem Fas-Rezeptor (Fas) oder dem TRAIL-Rezeptor, eine zentrale Rolle für die Auslösung der Apoptose. In diversen wissenschaftlichen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem Erscheinungsbild verschiedenster Krankheiten und einer hierfür ursächlichen pathologischen Fehlsteuerung der Apoptose hergestellt. (Steller, Science 267, 1445-1449, 1995, Thompson, Science 267, 1456-1462, 1995, Nagata, Cell 88, 355-365, 1997, Giordano et al., Science 275, 960-963, 1997, Chervonsky et al., Cell 89, 17-24, 1997). Sowohl eine überschießende apoptotische Reaktion als auch der Verlust extrazellulärer apoptotischer Signale führt zu pathophysiologischen Zuständen, Erkrankungen oder Störungen im lebenden Organismus. Dabei ist in vielen Fällen die exakte Ätiologie der apoptotischen Fehlfunktion unklar. In einigen Fällen wiederum wird nur ein Zusammenhang zwischen der fehlgesteuerten apoptotischen Kontrolle und dem jeweiligen Syndrom vermutet. Eine spezifische, ursächlich ausgerichtete medizinisch-pharmazeutische Behandlung ist hingegen in keinem Fall gegeben.

Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, pathophysiologische Zustände, Erkrankungen und Störungen zu identifizieren, die auf einer gesteigerten apoptotischen Aktivität beruhen, und für derartige Fehlsteuerungen eine geeignete, zielgerichtete und die Ursachen berücksichtigende pharmazeutischen Behandlung zu entwickeln, die schließlich auf die apoptotische Überschußreaktion inhibierend wirkt. Diese Aufgabe löst die vorliegende Erfindung durch die Ansprüche 1 bis 3. Darüber hinaus lag der vorliegenden Erfindung die weitere Aufgabe zugrunde, bei bislang zur unspezifischen und teilweise erfolglosen Behandlung eingesetzten Substanzmischungen, jene Bestandteile zu identifizieren, die für

den therapeutischen Erfolg ursächlich sind. Hieraus ergibt sich weiterhin die Aufgabe, Verfahren zur Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle derartiger unspezifischer Substanzmischungen zu entwickeln, die schließlich eine uneingeschränkt erfolgreiche medizinische Verwendung erlauben. Diese Aufgabe wird durch den Anspruch 4 gelöst. Weiterhin war es eine Aufgabe der Erfindung, derartige Substanzmischungen in ihrer pharmazeutischen Wirksamkeit so zu verbessern, daß sie zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zustände eine erhöhte pharmazeutische Wirksamkeit aufweisen. Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Ansprüche 10 bzw. 13 gelöst.

15 Die Erfinder haben gezeigt, daß die Verwendung von Zusammensetzungen, die gewisse gegen Fas gerichtete Antikörper (anti-Fas-Antikörper) enthalten, zur Behandlung von huma-
nen oder tierischen Zuständen mit überschießender apopto-
tischer Reaktion dann geeignet sind, wenn diese gestei-
20 gerte apoptotische Reaktion auf erhöhten extrazellulären FasL-Titern beruht. Derartige Zusammensetzungen können dann zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Syndromen mit vorgenannter Ätiologie eingesetzt werden. Dabei erweisen sich Zusammensetzungen, die die
25 FasL/Fas-Rezeptor-Interaktion inhibierende anti-Fas-
Antikörper enthalten, dann als besonders geeignet, wenn sie zur Behandlung von toxischer epidermaler Nekrose (Lyell's Syndrom), graft-versus-host Erkrankung, Hepati-
tis, fulminanter Hepatitis, Autoimmunthyroiditis
30 (Hashimoto's Thyroiditis), maligner Tumorerkrankungen oder HIV eingesetzt werden. Erfindungsgemäß wurde festge-
stellt, daß für die vorgenannten Erkrankungen zumindest im wesentlichen erhöhte extrazelluläre FasL-Titer verant-
wortlich sind, die schließlich sensitive humane Zellen
35 durch Apoptose abtöten. Die genannten Zusammensetzungen enthalten die FasL/Fas-Rezeptor-Interaktion inhibierende Antikörper, insbesondere anti-Fas-Antikörper. Es handelt sich bei diesen Zusammensetzungen vorzugsweise um natür-
liche Zusammensetzungen, insbesondere um Blutprodukte.

Im Fall der toxischen epidermalen Nekrolyse (TEN) wurde darüber hinaus erfindungsgemäß erstmals ein Zusammenhang mit einer auf apoptotischer Fehlsteuerung beruhenden Ätiologie hergestellt. Die vorgenannte Erkrankung beruht erfindungsgemäß auf einem massenhaften apoptotischen Tod von Epidermiszellen. Dies führt schließlich zu einer Separierung von Dermis und Epidermis mit einem tödlichen Ausgang in ungefähr 30% der betroffenen Fälle (Roujeau, Stern, New England Journal of Medicine 331, 1272-1285, 1994). Während normalerweise die Apoptose von Keratinozyten in der Epidermis ein seltes Ereignis ist, ist die Apoptose dieser Zellen bei Patienten mit toxischer epidermaler Nekrolyse stark erhöht. Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß bei Patienten mit TEN ungewöhnlich hohe Titer von löslichem FasL in den entsprechenden Seren vorliegen. Aus verschiedenen Veröffentlichungen (Gutierrez-Steil et al., Journal Clinical Investigations 101, 33-39, 1998, Berthou et al., Journal Immunology 159, 5293-5300, 1997) ist weiterhin bekannt, daß Keratinozyten gewöhnlich nur wenig FasL exprimieren. Allerdings kann im Falle adäquater Stimulation die FasL-Produktion bei Keratinozyten induziert werden (Gutierrez-Steil et al. Journal Clinical Investigations 101, 33-39, 1998). Erfindungsgemäß wurde weiterhin gezeigt, daß Keratinozyten von TEN-Patienten eine hohe FasL-Expression aufweisen, während gesunde Kontrollpersonen insoweit unauffällig waren.

Außerdem wurde erfindungsgemäß nachgewiesen, daß das bisher unspezifische und nur im Einzelfall nur bei inflammatorischen oder Autoimmunerkrankungen erfolgreich eingesetzte IVIG (Intravenöses Immunoglobulin, das als Blutprodukt aus "gepooltem" Plasma von gesunden Spendern hergestellt wird) auch zur Behandlung von humanen oder tierischen pathophysiologischen Zuständen mit erhöhter extrazellulärer FasL Konzentration, insbesondere TEN, eingesetzt werden kann. Weitere erfindungsgemäße Untersuchungen ergaben, daß eine Wirkung von IVIG-Gemischen bei den vorgenannten Erkrankungen, die auf erhöhten FasL-Titern

beruhen, dann festzustellen ist, wenn die IVIG-Gemische anti-Fas-Antikörper enthalten, die die Interaktion von Fas mit dem extrazellulären Liganden FasL blockieren.

5 IVIG-Gemische als natürliches Blutprodukt weisen allerdings nur im Einzelfall jene Qualität auf, die es erlaubt, sie pharmazeutisch wirksam zur Behandlung jener Erkrankungen oder Störungen zum Einsatz zu bringen, die sich auf erhöhte extrazelluläre FasL-Titer zurückführen
10 lassen. Hierzu müssen, wie erfindungsgemäß festgestellt, ausreichende, die FasL/Fas-Interaktion inhibierende anti-Fas-Antikörper-Titer vorliegen. Um eine frühzeitige Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle der natürlichen Blutplasmaprodukte durchführen zu können, wurden erfindungsgemäß immunologische Verfahren zur Verfügung gestellt, die eine Bestimmung der anti-Fas-Antikörper-Titer in beliebigen pharmazeutischen Zusammensetzungen, insbesondere aber in IVIG-Gemischen, erlauben. Erst nach einer derartigen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle ist eine zielgerichtete
15 Verwendung derartiger Zusammensetzungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, die auf erhöhten extrazellulären FasL Konzentrationen beruhen, möglich. Sinnvollerweise werden die immunologisch positiv getesteten Chargen zur Behandlung eingesetzt,
20 während andere Chargen ohne anti-Fas-Antikörper-Aktivität nach dem Testen mit den vorgeschlagenen, erfindungsgemäß in vitro Verfahren verworfen und damit ihre Verwendung zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen bzw. ihre Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur
25 Behandlung der vorgenannten Erkrankungen ausgeschlossen wird. Hierdurch wird neben Zusammensetzungen, insbesondere IVIG-Gemischen, mit geringer Spezifität für die Verwendung als Arzneimittel zur Behandlung von Erkrankungen mit hohen extrazellulären FasL-Titern nunmehr eine spezifische, durch die erfindungsgemäß Verfahren hergestellte und hinsichtlich ihrer Qualität und Eignung geprüfte Zusammensetzung, insbesondere also ein geeignetes Blutprodukt, für den obigen Zweck zur Verfügung gestellt.
30
35

Erfindungsgemäß erweisen sich als geeignete Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle von natürlichen Zusammensetzungen mit einem Inhibitionspotential auf die überschießende Apoptosereaktion, insbesondere also solche Systeme, die die Messung von Rezeptor/Liganden-Interaktion erlauben. Hierzu wird zunächst in einem Verfahrensschritt (a) Fas, insbesondere dessen extrazelluläre Domäne, als Ligand im Testsystem eingesetzt, insbesondere bevorzugt wird dabei ein Fas-Fc-Fusionsprotein, das mit potentiell zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen geeigneten Zusammensetzungen, also beispielsweise von IVIG-Gemischen, inkubiert wird. Anschließend wird markiertes FasL der gemäß Verfahrensschritt (a) vorinkubierten Lösung zugesetzt und schließlich erfundungsgemäß der Anteil von an Fas oder beispielsweise an Fas-Fc-Fusionsprotein gebundenem FasL mit Hilfe physikalischer oder chemischer Methoden bestimmt. Besonders geeignet sind dabei spektroskopische Methoden, insbesondere solche spektroskopischen Verfahren, die auf Absorption oder Fluoreszenz im sichtbaren oder nahen UV-Bereich beruhen. Hierbei stehen dem Fachmann alle ihm geläufigen Vorgehensweisen zur Verfügung, z.B. eine direkte Markierung von FasL mit Chromophoren oder auch gegen FasL gerichtete Antikörper, die dann ihrerseits z.B. mit Chromophoren markiert sein können. Die gegen FasL gerichteten und markierten Antikörper können dabei natürliche Epitope von FasL erkennen oder auch gegen Markierungen auf dem FasL-Protein, nämlich beispielsweise eingeführte rekombinante Abschnitte (z.B. gegen die sog. Flag-Sequenz), gerichtet sein.

Als weiteres für die Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle von Zusammensetzungen, insbesondere von IVIG-Gemischen, der vorgenannten Art adäquates immunologisches Verfahren wird ein Testsystem zur Verfügung gestellt, das auf dem durch FasL/Fas vermittelten Zelltod beruht. Hierbei werden Zellen von Fas-sensitiven Zelllinien (z.B. Jurkat-Zellen oder die lymphoblastoide Zelllinie A20) mit der zu

untersuchenden und auf ihre Eignung zu prüfenden Zusammensetzung vorinkubiert und anschließend dieser vorinkubierten Präparation FasL zugesetzt (beispielsweise rekombinantes humanes lösliches FasL). Schließlich wird die 5 Zahl derjenigen Fas-sensitiven Zellen ermittelt, die durch die FasL/Fas-Interaktion im Wege der Apoptose untergegangen sind. Enthält die untersuchte Zusammensetzung anti-Fas-Antikörper, die den FasL/Fas-Transduktionsmechanismus blockieren, so werden Fas- 10 sensitive Zellen durch die Zusammensetzung vor der Apoptose bewahrt. Damit erwiese sich eine Zusammensetzung als zur Verwendung für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der vorgenannten Störungen geeignet. Kontrollversuche mit gegenüber der durch Fas/FasL ausgelösten Apoptose resistenten Zellen vermeiden eine Fehlin- 15 terpretation der ggf. positiven Resultate mit den Fas-sensitiven Zelllinien. Für die Bestimmung des durch die FasL-Aktivität bewirkten Ausmaßes der Apoptose unter den Fas-sensitiven Zellen kann beispielsweise ein Annexin- 20 FITC Zelltodtest, wie er von der Alexis Corporation, San Diego, USA, vertrieben wird, oder auch ein Assay zur Bestimmung der Zellebensfähigkeit, wie er von Boehringer, Mannheim, Deutschland, unter der Bezeichnung WST-1 vertrieben wird, herangezogen werden.

25 Darüber hinaus erweisen sich auch Immunoblotting-Methoden als geeignet, um als Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle von potentiell pharmazeutisch wirksamen Zusammensetzungen zur Behandlung der vorgenannten Erkrankungen eingesetzt werden zu können. Hierbei werden extrazelluläre Abschnitte von Fas durch Blotting-Techniken mit den ggf. anti-Fas-Antikörper enthaltenden Zusammensetzungen, z.B. auch IVIG-Gemischen, in Berührung gebracht und daraufhin die an Fas gebundenen 30 Bestandteile der Zusammensetzung, also ggf. in der Zusammensetzung enthaltene anti-Fas-Antikörper durch gegen diese gerichtete Sekundär-Antikörper identifiziert. Für die Identifizierung können die Sekundär-Antikörper auf 35 jede dem Fachmann geläufige Weise markiert werden. Als

besonders geeignet erweisen sich neben Markierungen mit Chromophoren auch Markierungen mit Enzymen, die quantifizierbar und meßbar Substrate umsetzen. Dabei kann es sich bei den zur Markierung verwendeten Enzymen z.B. um Meerrettich-Peroxidase handeln. Auch bei diesem Verfahren werden durch die Markierungen am Sekundär-Antikörper jene Chargen der Zusammensetzung (also etwa von IVIG-Gemischen oder anderen Blutprodukten) positiv bestimmt, die zur zielgerichteten Behandlung der vorgenannten Störungen herangezogen werden können.

Die oben stehenden Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle von Zusammensetzungen, insbesondere natürlichen Blutprodukten, vor allem aber IVIG-Gemischen, die sich grundsätzlich zur Behandlung von Störungen oder Erkrankungen mit erhöhten FasL-Titern eignen, können auch Bestandteil von Verfahren sein, die der Aufbereitung oder Verbesserung dieser Zusammensetzungen dienen. Damit wird der Zweck verfolgt, Zusammensetzungen, insbesondere natürliche Blutprodukte, mit gesteigerter pharmazeutischer Wirksamkeit zur Verfügung zu stellen. Hierzu werden in einem Verfahrensschritt (a) die Zusammensetzungen, also beispielsweise Blutprodukte und insbesondere IVIG-Gemische, zunächst biochemisch fraktioniert. Dieser Fraktionierungsschritt erfolgt auf dem Fachmann geläufige Art. In einem weiteren Verfahrensschritt (b) werden die Fraktionen auf ihre Eignung bzw. Qualität, d.h. auf das Vorliegen etwaiger anti-Fas-Antikörper hin untersucht. Dabei werden die vorher beschriebenen Verfahren, also z.B. ein Rezeptor/Ligandenbindungs-Test, Blotting-Techniken und/oder Zelltod-Assays ausgeführt. Sie alle dienen allein oder in Kombination zur Bestimmung der anti-Fas-Antikörper-Titer in der jeweiligen Fraktion. Daraufhin wird (werden) diejenige(n) Fraktion(en) isoliert, die mit Hilfe der z.B. vorgenannten immunologischen Verfahren positiv auf anti-Fas-Antikörper getestet wurden (Verfahrensschritt (c)). Schließlich wird (werden) in einem Verfahrensschritt (d) die oder diese Fraktion(en) aufkonzentriert, so daß pharmazeutisch wirksame

und die FasL/Fas-Interaktion inhibierende anti-Fas-Antikörper angereichert werden. Das Produkt dieses Herstellungsverfahrens weist eine erhöhte anti-Fas-Antikörper-Konzentration auf, besitzt eine erhöhte pharmazeutische Wirksamkeit und kann dann als Arzneimittel zur Behandlung von Störungen oder Erkrankungen mit erhöhten extrazellulären FasL-Titern oder zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung derartiger Störungen eingesetzt werden.

10

Dabei umfaßt das Einsatzgebiet derartiger Arzneimittel sowohl die Human- als auch die Veterinärmedizin.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform wird dabei der Verfahrensschritt (d) des vorbeschriebenen Verfahrens zur Herstellung eines Arzneimittels derart durchgeführt, daß die anti-Fas-Antikörper in aufgereinigter Form aus der ursprünglichen Zusammensetzung, die insbesondere ein IVIG-Gemisch ist, erhalten wird. Hierzu bieten sich insbesondere chromatographische Verfahren an, die die Affinität zwischen Antigen und Antikörper für die Aufreinigung ausnutzen. Ganz besonders bevorzugt sind daher säulenchromatographische Verfahren, bei denen das Antigen, hier also das Fas-Protein, besonders vorteilhaft ein Fas-Fusionsprotein, auf dem Träger angekuppelt wird. Die am z.B. Fas-Fusionsprotein gebundenen anti-Fas-Antikörper werden schließlich durch den Fachmann geläufige Verfahren, z.B. durch Salzlösungen, von der Säule eluiert (Verfahrensschritt (e)). Durch ggf. zwei oder mehrmalige Wiederholung eines solchen Reinigungsschritts, vorzugsweise verbunden mit anderen biochemischen Reinigungsverfahren, kann der Grad der Aufreinigung der für die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels geeigneten anti-Fas-Antikörper weiter erhöht werden.

20

25 30 35 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von humanen oder tierischen Erkrankungen mit erhöhten extrazellulären FasL-Titern derart modifiziert, daß

im Ergebnis ein hochspezifisches Arzneimittel zur Verfü-
gung gestellt wird. Hierzu wird die - wie oben beschrie-
ben - im wesentlichen durch chromatographische Methoden
vorgereinigte Zusammensetzung bzw. insbesondere das
5 "gepoolte" Blutprodukt derart weiterbehandelt, daß nur
solche anti-Fas-Antikörper als Arzneimittel Verwendung
finden, die bestimmte Epitope auf dem Fas-Protein erken-
nen. Hiermit wird ausgeschlossen, daß auch ggf. die Apop-
tose stimulierende anti-Fas-Antikörper als Produkt des
10 Reinigungs-, Herstellungs- bzw. Aufbereitungsverfahrens
für die spätere Verwendung als Arzneimittel enthalten
sind. Dieses Ziel wird dadurch erreicht, daß ein oder
mehrere affinitätschromatographische Schritt(e) der Elu-
ierung der anti-Fas-Antikörper gemäß Verfahrensschritt
15 (e) nachgeschaltet wird (werden). Hierbei werden auf dem
Trägermaterial ausgesuchte Epitope des Fas-Proteins, die
zur Inhibierung der FasL/Fas-Bindung besonders geeignet
erscheinen, als Liganden auf dem Träger angekuppelt. Im
Ergebnis wird eine epitopspezifische anti-Fas-Antikörper-
20 Subfraktion durch die Verfahrensschritte (a) bis (g) iso-
liert. Im einzelnen wird hierzu nach der Eluierung (gemäß
Verfahrensschritt (e)) ein Verfahrensschritt nachgeschal-
tet, bei dem das gemäß (e) erhaltene Eluat über eine oder
mehrere Affinitätschromatographiesäulen geführt wird. Auf
25 dieser (diesen Säulen) sind Epitope auf dem Trägermateri-
al angekuppelt, die etwaige gegen diese gerichtete Anti-
körper binden. Die Epitope entsprechen Teilsequenzen des
FaS-Proteins, so daß spezifisch anti-Fas-Antikörper aus
dem Eluat gemäß (e) isoliert werden. Damit steht zur Be-
30 handlung von Erkrankungen mit erhöhten extrazellulären
FasL-Titern, insbesondere TEN, ein hochspezifisches Arz-
neimittel zur Verfügung.

35 Diese durch die Verfahrensschritte (a) bis (g) erhaltene
anti-Fas-Antikörper-Subfraktion wird vorteilhafterweise
gallenisch noch dadurch aufbereitet, daß die isolierten
anti-Fas-Antikörper nach ihrer Sequenzierung mit gängigen
gentechnologischen Verfahren in humanisierter Form Ver-
wendung finden. Dieser Schritt erweist sich dann als er-

forderlich, wenn die den Verfahren zugrundeliegende Zusammensetzung nicht humanes Blutprodukt darstellt, sondern z.B. tierischen Ursprungs ist. Die nach den oben beschriebenen Verfahren 10 bis 12 erhaltenen Verfahrensprodukte werden zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von humanen oder tierischen Zustände mit pathophysiologisch erhöhten extrazellulären FasL-Titern, insbesondere zur Behandlung von toxischer epidermaler Nekrose, graft-versus-host disease, Hepatitis, fulminater Hepatitis, Autoimmunthyroiditis, malignen Tumorerkrankungen oder HIV verwendet.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Figuren 1 bis 11, sowie durch Tabelle 1 näher erläutert:

15 Figur 1 stellt einen Hautgewebeschnitt eines TEN-Patienten dar. Zu erkennen ist, daß die Epidermis ((durch ein Symbol markiert) sich von der darunter befindlichen Epidermis abgelöst hat, ein charakteristisches pathologisches Phänomen bei TEN-Patienten.

25 Figur 2 dokumentiert die charakteristisch erhöhten Serumtiten von löslichem FasL (sFasL) bei TEN-Patienten. Die sFasL-Konzentrationen liegen oberhalb von 0,5 ng/ml in deren Seren. Dagegen sind die Serumkonzentrationen von gesunden Kontrollpersonen oder Patienten mit einer anderen Hauterkrankung (MPR: makulös-populärer Hautausschlag), die gleichfalls als Negativkontrolle eingesetzt wurden, hinsichtlich der sFasL-Titer unauffällig.

30 Figur 3 zeigt einen Gewebeschnitt der Haut von Ten-Patienten nach histologischer Auswertung. Die Symbole deuten auf apoptotische Keratinozyten hin.

35 Die folgenden Figuren 4 bis 7 verdeutlichen, daß eine hochregulierte FasL-Produktion von Keratinozyten für den Fas-vermittelten apoptotischen Untergang von Keratinozyten (s. Fig. 3) verantwortlich ist.

Figur 4 zeigt zur Überprüfung einen Immunoblot von monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen FasL. Spur 1 enthält ein 293-scheintransfiziertes Zellysat, Spur 2 ein 5 293-FasL-transfiziertes Zellysat. Die Antikörperreaktion ist spezifisch gegen die entsprechend transfizierten Zellen gerichtet.

In Figur 5 werden Abbildungen von Hautgewebeschnitten 10 dargestellt, die immunohistochemisch untersucht wurden. Die Schnitte von Hautgeweben gesunder Personen und von TEN-Patienten wurden mit anti-FasL-Antikörpern behandelt. Zur Kontrolle wurden Kontroll-Antikörper eingesetzt, die die unspezifische Antikörperreaktion wiedergeben. Deutlich 15 ist in der mittleren Darstellung der oberen Reihe die starke Antikörperreaktion gegen FasL in der Epidermis von TEN-Patienten zu erkennen.

Figur 6 spiegelt das Resultat (mit statistischen Fehlern) 20 der Experimente mit Fas-sensitiven Jurkat-Zellen wider, die auf Kryohautgewebeschnitte von gesunden, TEN- und MPR-Patienten geschichtet wurden. Die Balken geben den Prozentsatz der jeweils nach 6-stündiger Inkubation apoptotischen Jurkat-Zellen wieder, so wie durch Flußcytometrie 25 bestimmt. Hierbei lösen die Gewebe von TEN-Patienten eine signifikant erhöhte apoptotische Reaktion aus. Diese wird durch FasL-blockierende Antikörper (NOK1) stark verringert (4. Balken) (Kontrolle).

30 Figur 7 zeigt schließlich die Lebensfähigkeit von Jurkat-Zellen bzw. primären humanen Keratinozyten gegenüber rhsFasL (Alexis Corporation) nach 6- bzw. 16-stündiger gemeinsamer Inkubation. Dabei erweisen sich auch Keratinozyten als FasL-sensitiv.

35

Die folgenden Figuren 8 bis 11 stellen die Inhibition der Fas-vermittelten Apoptose durch anti-Fas-Antikörper dar, die in IVIG-Gemischen enthalten sind.

Dabei gibt Figur 8 die protektive Funktion von IVIG-Gemischen auf verschiedene Zelllinien (HEK: primäre humane Keratinozyten, HaCaT: humane Keratinozyten, HepG2: Hepatocarcinomzellen, A20: Fas-sensitive lymphoblastoide Zelllinien) wieder, die sich nach Zugabe von Apoptose auslösendem rhsFasL ergibt. Gemessen wurde der Prozentsatz der vor der Apoptose bewahrten Zellen (Lebensfähigkeit), bezogen auf die Lebensfähigkeit der Zellen in Abwesenheit von rhsFasL. Die Ergebniss der Vergleichsversuche ohne IVIG bzw. mit Albumin (zur Beurteilung unspezifischer Reaktionen) sind gleichfalls aufgetragen. Die protektive Wirkung von IVIG-Gemischen (im Vergleich zu Ansätzen ohne Zugabe von IVIG-Gemischen) ist für alle sensiblen Zelllinien erkennbar.

Figur 9 beschreibt die Wirkung von IVIG-Gemischen auf die Bindung von FasL an Fas und von TRAIL (einem anderen Apoptose auslösenden Liganden) an den Rezeptor TRAIL R2 (rechts). Die Bindung von dem Liganden an den Rezeptor wurde so gemessen, wie bei Schneider et al., J. Exp. Med. 1197, 1-9, 1998 und Schneider et al. J. Biol. Chem. 272, 18827-18833, 1997 beschrieben. Die linke Darstellung in Figur 9 zeigt die inhibierende Wirkung von IVIG-Gemischen auf die Bindung von FasL an Fas.

Figur 10 zeigt durch immunochemische Reaktion, daß IVIG-Gemische positiv gegenüber Fas reagieren, dagegen aber nur eine schwache Reaktion gegenüber TNFR1 (linke Darstellung) zeigen. Die mittlere und die rechte Darstellung sind Kontrollversuche. IVIG-Gemische weisen also anti-Fas-Antikörper auf.

Figur 11 zeigt die Lebensfähigkeit (als Prozentsatz der Kontrollzellen) gegen rhsFasL nach Präinkubierung mit Träger, IVIG, Fas-Fc-Fusionsprotein oder TAIL2-Fc immunoabsorbiertem IVIG-Gemisch (als Kontrolle). Wiederum bewahrt das IVIG-Gemisch die hier eingesetzten A20-Zellen weitgehend vor der Apoptose. Etwaige anti-TRAIL-2-

Antikörper sind - wie durch den Kontrollversuch gezeigt - ohne Bedeutung für die protektive Wirkung des IVIG-Gemisches.

5 Tabelle 1 gibt die klinischen Daten von 10 TEN-Patienten wieder, die mit IVIG-Gemischen behandelt wurden. Im einzelnen sind angegeben: (a) Alter/Geschlecht Patienten, (b) die von Erythema bzw. Epidermis-Ablösung betroffene Körperoberfläche, (c) der medikamentöse Auslöser für TEN, 10 (d) die verabreichte Dosis des IVIG-Gemisches in g/kg/d bzw. die Dauer der Behandlung mit IVIG in Tagen, (e) der Zeitraum vom Beginn der klinischen Symptome bis zum Behandlungsbeginn in Tagen, (f) der Zeitraum bis zur klinischen Reaktion auf die Behandlung bzw. der Hautheilung.

15

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

1. Ausführungsbeispiel

20

Erfindungsgemäß wurde gezeigt, daß das Lyell's Syndrom (TEN) in seiner Ätiologie auf erhöhten löslichen FasLTitern in den Seren von betroffenen Patienten beruht. Hierzu wurden vergleichsweise Blutseren von klinisch auffälligen Personen mit jenen von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Der klinischen Auffälligkeit von TEN-Patienten lag die Beobachtung zugrunde, daß diese an zusammenhängenden, häufig dunkelfarbigen Erythemen leiden, wobei eine spontane Ablösung der Epidermis (von der Dermis) zu beobachten ist, genauso wie im übrigen auch Muco-sa-Erytheme und Geschwüre. Die klinische auffällige Epidermisablösung wurde durch histologische Befunde bei allen TEN-Fällen bestätigt. Bei allen untersuchten TEN-Patienten betrug die Fläche der erythematösen und abgelösten Epidermis 60 oder mehr Prozent der gesamten Körperoberfläche (Figur 1).

Der Nachweis der löslichen FasL-Fraktion im Serum der untersuchten Patienten wurde durch ELISA geführt. Hierbei ergab sich eine 100%ige Korrelation zwischen hohen FasL-Titern bei TEN-Patienten und annähernd nicht nachweisbaren Titern bei gesunden Kontrollpersonen (Figur 2). Serum-Aliquots wurden Patienten mit voll ausgebildeter TEN bzw. gesunden Kontrollpatienten entnommen und mit einem sFasL ELISA-KIT (Medical & Biological Laboratories Ltd, unter Einsatz der anti-FasL Antikörper mAb 4H9 und 4A5) untersucht. Die gesunden Kontrollpatienten waren jünger als 40 und ohne Befund in bezug auf Haut- oder systemische Krankheiten.

Weiterhin wurde erfindungsgemäß gezeigt, daß bei TEN-Patienten der klinisch auffälligen Ablösung der Epidermis eine Apoptose der Keratinozyten vorausgeht (Figur 3). Dabei handelt es sich um ein früh sich morphologisch manifestierendes Ereignis dieses Syndroms. Um festzustellen, ob und, wenn ja, auf welche Weise es einen Zusammenhang zwischen der Keratinozyten-Apoptose und den auffälligen FasL-Serum-Titern gibt, wurden sowohl die Fas- als auch die FasL-Expression in den Hautproben von TEN-Patienten (N = 7) untersucht und mit jenen von gesunden Kontrollpersonen (N = 5) verglichen (Figur 5). Die Hautbiopsien wurden von TEN-Patienten aus der Grenzfläche zwischen abgelöster und nicht-abgelöster Haut entnommen. Die Biopsien wurden entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in Paraformaldehyd (4%) fixiert. Die Immunohistochemie wurde an den Kryoschnitten, wie bei French et al., J. Cell Biol. 133, 335-343, 1996 beschrieben, durchgeführt. Hierbei wurden monoklonale anti-FasL-Antikörper (A11, Alexis Corp., beschrieben bei Hahne et al. Science 274, 1363-1366, 1996) und monoklonale anti-Fas-Antikörper (UB2, Immunotech) und isotope Kontroll-Antikörper eingesetzt. Die histologischen Hautschnitte von TEN-Patienten zeigten eine starke Keratinozyten-Apoptose, eine nach immunhistochemischem Nachweis mit anti-FasL-Antikörper (mAb A11), eine im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen stark erhöhte FasL-Expression und eine gleichfalls, ver-

glichen mit gesunden Kontrollpersonen, nahezu unveränderte Fas-Expression auf der Zelloberfläche.

Schließlich wurde für TEN erfindungsgemäß gezeigt, daß die für TEN charakteristische Apoptose von Keratinozyten tatsächlich durch den FasL/Fas-Signaltransduktionsweg ausgelöst wird. Hierzu wurde die lytische Aktivität von kutanem FasL in vitro untersucht. Gefrierschnitte der Haut von gesunden Kontrollpersonen (N = 5) und TEN-Patienten (N = 3) wurden mit Fas-sensitiven Jurkat-Zellen für die Dauer von sechs Stunden in Kontakt gebracht und anschließend die Apoptose der Jurkat-Zellen mit Hilfe eines Annexin FITC-Tests oder eines Cytochrom c-Tests bestimmt. Erfindungsgemäß wurde hierbei festgestellt, daß die TEN-Hautschnitte in reproduzierbarer Weise (sowohl mit dem Annexin-FITC als auch mit dem Cytochrom c-Assay) drei- bis vierfach so viele Jurkat-Zellen abtöten wie entsprechende Hautschnitte von gesunden Kontrollpersonen (Figur 6).

Weiterhin wurde experimentell gezeigt, daß in Gegenwart von FasL-blockierenden Antikörpern (NOK 1) die durch die TEN-Hautgewebeschnitte induzierte Cytotoxizität bei den Jurkat-Zellen vollständig ausgeschaltet wurde (Figur 6). Hierzu wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten mit anti-FasL-Antikörpern (NOK 1, 2,5 µg/ml, Pharmingen) vorinkubiert, anschließend auf die Fas-sensitiven Jurkat-Zellen (humane Leukämiezellen) gelegt, so wie bereits bei Strand et al., Nature Medicine 2, 1361-1366, 1996 oder bei Büchner et al., Journal Clinical Investigation 100, 2691-2699, 1997, beschrieben. Auch hier wurde die Anzahl der durch Apoptose lytischen Jurkat-Zellen mit Hilfe der Flußzytometrie unter Einsatz des Annexin-FITC (Pharmingen, so wie bei Vermes, Haanen, Steffens-Nakken, Reutelingsperger, Journal Immunology Methods, 184, 39-51, 1995) beschrieben. Auch die Zugabe von löslichem rekombinantem menschlichem FasL (rhs FasL) ergab erfindungsgemäß, daß menschliche Keratinozyten in dessen Gegenwart apoptosesensitiv sind (Figur 7). Hierzu wurden

mit FLAG markierte lösliche rekombinante FasL-Proteine (Alexis Corporation) mit Jurkat-Zellen für die Dauer von sechs bzw. sechzehn Stunden inkubiert und anschließend die Lebensfähigkeit mit Hilfe eines Proliferationstests (WST-1, Boehringer, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

2. Ausführungsbeispiel

10 In diesem zweiten Ausführungsbeispiel wurde erfindungsgemäß gezeigt, daß IVIG (intravenöses Immunglobulin) als Blutprodukt, das aus "gepooltem" Plasma von gesunden Spendern hergestellt wird, als Inhibitor der durch FasL/Fas vermittelten Apoptose fungieren kann.

15 Hierzu wurden Keratinozyten vor ihrer Exposition gegenüber rhsFasL gemeinsam mit IVIG inkubiert. Dabei wurde festgestellt, daß bei rhs-FasL-Konzentrationen, die eine 75%ige Keratinozyten-Apoptose zu induzieren vermögen, die Zugabe von IVIG, nämlich 30 mg/ml (berechnet entsprechend der täglichen Dosis für die Behandlung eines 60 kg schweren Patienten) vollständig die Fas/FasL bedingte Keratinozyten-Apoptose inhibiert. Bei diesem Experiment wurden Keratinozyten der Zelllinie HaCaT, Hepatokarzinom-Zellen (HepG2), Fas-sensitive Zellen A20 und Fas-resistente Lymphoblastoid-Zelllinien A20R mit IVIG (und Albumin als Kontrolle) inkubiert und schließlich lösliches FasL hinzugefügt (Figur 8).

30 Die protektive Wirkung von IVIG ist dabei nicht auf die zuvor genannten Keratinozyten beschränkt, sondern erfaßt alle Fas-sensitiven Zellen. Im vorliegenden Experiment wurde zudem nachgewiesen, daß IVIG spezifisch wirkt, da ähnliche Konzentrationen von Albumin keine Apoptose-Protektion bewirken.

35 In einem weiteren Experiment zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von IVIG wurde gezeigt, daß dessen protektive Wirkung auf einer Inhibition des Fas-vermittelten Zelltods beruht, indem der Fas-Rezeptor, nicht aber der Fas-

Ligand (FasL) blockiert wird. Dabei wurde ein IVIG-Gemisch mit rhsFasL präinkubiert und diese präinkubierte Mischung schließlich mit den vorgenannten Zelllinien kontaktiert. Hierbei konnte keine lytische, d.h. apoptotische Wirkung auf die Zellen dieser Zelllinien festgestellt werden.

In einem weiteren Experiment im Rahmen dieses Ausführungsbeispiels wurde schließlich nochmals mit Hilfe eines ELISA bestätigt, daß IVIG-Gemische die Fas/FasL-Interaktion inhibieren. Hierzu wurde die Rezeptor-Liganden-Interaktion in An- oder Abwesenheit von IVIG bestimmt. Im Ergebnis wurde dokumentiert, daß die Bindung von rhsFasL an Fas-Fc-Fusionsprotein signifikant durch IVIG inhibiert wird, während die Bindung von löslichem TRAIL an seinem Rezeptor TRAIL R2 (hier als TRAIL R2-Fc-Fusionsprotein eingesetzt) durch das IVIG-Gemisch nicht blockiert wurde. Auch bei TRAIL handelt es sich um einen die Apoptose auslösenden Liganden, auf dessen Bindungsinhibition auch die protektive Wirkung von IVIG hätte beruhen können. Dieses Vergleichsexperiment ergibt wiederum, daß durch ein IVIG-Gemisch spezifisch die FasL/Fas-Interaktion blockiert wird.

25 3. Ausführungsbeispiel

Dieses Ausführungsbeispiel dient der Bestimmung der molekularen Ursache für die inhibitorische Wirkung von IVIG. Um zu zeigen, daß diese Wirkung auf in der IVIG-Zusammensetzung natürlicherweise vorhandenen anti-Fas-Antikörpern beruht, wurde untersucht, ob ein Bestandteil des IVIG-Gemisches an menschliches Fas bindet und schließlich, ob eine anti-Fas-Antikörper negative IVIG-Fraktion dessen Fähigkeit zur Inhibition der Fas-vermittelten Apoptose beseitigt.

Hierzu wurde auf einem Gel eine Immunodetektion vorgenommen. Das IVIG-Gemisch wurde gegen Albumin (zur Kontrolle) oder gegen gereinigte rekombinante Proteinkonstrukte ein-

gesetzt, die aus der extrazellulären Domäne des humanen Fas (sog. Fas-Comp) oder der extrazellulären Domäne des Tumornekrose-Faktor-Rezeptors (TNFR1-Comp), jeweils verschmolzen mit einem 55 Aminosäure langen Linker, bestehen. Hierbei bezeichnet "Comp" den Linker, wie er sich auch bei Terskikh et al., Proceedings of the National Academy of Science, USA, 94, 1663-1668, 1997, beschrieben findet. Diese Experimente zeigen, daß für IVIG-Gemische deutlich positive Signale gegenüber Fas-Comp, nicht aber gegenüber Albumin, und nur schwache Signale gegenüber TNFR1-Comp detektiert werden (Figur 10). Dies läßt darauf schließen, daß zumindest eine geringfügige anti-TNFR1-Aktivität in IVIG-Gemischen vorhanden sein könnte. Eine Beseitigung der anti-Fas-Antikörper aus dem IVIG-Gemisch durch mehrmaliges Aufreinigen über Fas-Fc-Fusionsprotein-Affinitätschromatographiesäulen beweist, daß durch den Verlust der anti-Fas-Antikörper sowohl die Bindungsfähigkeit von IVIG an Fas-Comp als auch die Blockade des Fas-vermittelten Zelltods beseitigt wird.

20

4. Ausführungsbeispiel

In einer offenen, nicht kontrollierten Pilotstudie wurden 10 verschiedene Patienten mit TEN in drei verschiedenen Krankenhäusern (Genf, Lausanne und Bern) mit IVIG behandelt, wobei die bei den Patienten eingesetzten Dosierungen von 0,2 bis 0,75 g/kg/d für die Dauer von vier aufeinanderfolgenden Tagen betrugen. Bei allen 10 Patienten wurde die Progression von TEN schnell nach der IVIG-Gemisch-Infusion (innerhalb von 24 bis 48 Stunden) unterbrochen. Gegenwirkungen stellten sich nicht in signifikantem Maß ein, vielmehr wurde eine schnelle Hautheilung beobachtet (s. Tabelle 1). Damit wurde in einer klinischen Studie die therapeutische Wirkung von IVIG bei TEN-Patienten erfindungsgemäß erstmals gezeigt.

Tabelle 1

Patient/ Age (YR)/ Sex	Erythema (%)/ Detachment (%) *	Causal Drug	Dose of IVIG (g/kg/d)/ duration (d)	Time from onset to treatment (d) †	Time to response/ skin healing (d) §
1. ME/23/M	50/50	Ibuprofen	0.75/4	5	2/7
2. BG/22/F	50/30	Carbamaz- epin	0.75/4	4	1/7
3. ER/57/F	40/20	Cipro- floxacin	0.375/4	3	2/5
4. MP/11/M	70/20	Paracetamol	0.75/4	4	1/6
5. BK/26/M	20/60	Ceftriaxon	0.75/4	2	1/10
6. IF/88/F	50/10	Allopurinol	0.2/4	4	2/5
7. FD/13/M	60/40	Cefuroxim	0.45/4	2	2/9
8. HW/65/M	60/30	Doxycyclin	0.75/4	4	2/12
9. CM/28/F	80/5	Undetermin.	0.75/4	4	1/4
10. PE/61/M	40/20	Phenytoin	0.75/4	4	1/4

ANSPRÜCHE

1. Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von humanen oder tierischen Erkrankungen mit pathophysiologisch erhöhten extrazellulären FasL-Titern, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung die FasL/Fas-Rezeptor-Interaktion inhibierende anti-Fas-Antikörper enthält.
5
- 10 2. Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 1 zur Behandlung von toxischer epidermaler Nekrose, graft-versus-host disease, Hepatitis, fulminanter Hepatitis, Autoimmunthyroiditis, malignen Tumorerkrankungen oder HIV.
15
- 20 3. Verwendung einer Zusammensetzung zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzung ein IVIG-Gemisch ist.
25
- 25 4. Verfahren zur prophylaktischen in vitro Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle einer Zusammensetzung, insbesondere eines IVIG-Gemisches, für die Verwendung derselben zur Herstellung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die FasL/Fas-Rezeptor-Interaktion inhibierende anti-Fas-Antikörpertiter der Zusammensetzung, insbesondere eines IVIG-Gemisches, immunologisch bestimmt werden.
30
- 30 5. Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle einer Zusammensetzung, insbesondere eines IVIG-Gemisches, nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß
 - 35 (a) Präparationen von Fas-Fc-Fusionsprotein mit einer Zusammensetzung, insbesondere einem IVIG-Gemisch, inkubiert werden,
 - (b) markiertes FasL der gemäß Verfahrensschritt (a) inkubierten Lösung zugesetzt wird, und

(c) der Anteil von an Fas-Fc-Fusionsprotein gebundenem FasL physikalisch oder chemisch bestimmt wird.

5

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil von an Fas-Fc-Fusionsprotein gebundenem FasL spektroskopisch, insbesondere photochemisch durch Absorption im sichtbaren oder nahen UV-Bereich, bestimmt wird.

10

7. Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle einer Zusammensetzung, insbesondere eines IVIG-Gemisches, nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß

15

- (a) Fas-sensitive Zellen mit einer Zusammensetzung, insbesondere einem IVIG-Gemisch, vorinkubiert werden,
- (b) dieser vorinkubierten Präparation lösliches FasL zugesetzt wird, und
- (c) schließlich die Anzahl der durch FasL/Fas-Interaktion apoptotischen Fas-sensitiven Zellen bestimmt wird.

20

25

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Anzahl der apoptotischen Fas-sensitiven Zellen gemäß Verfahrensschritt (c) durch einen Annexin-FITC-Zelltodtest oder die Bestimmung der Lebensfähigkeit mit Hilfe eines Zellproliferations-tests durchgeführt wird.

30

9. Verfahren zur prophylaktischen Eignungs- bzw. Qualitätskontrolle einer Zusammensetzung, insbesondere eines IVIG-Gemisches, nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß

35

- (a) ein extrazellulärer Abschnitt von Fas durch "Western-Blotting-Techniken" mit einer Zusammensetzung, insbesondere einem IVIG-Gemisch kombiniert wird, und

- 5 (b) an den extrazellulären Abschnitt von Fas gebundene anti-Fas-Antikörper aus der Zusammensetzung, insbesondere dem IVIG-Gemisch, durch markierte gegen anti-Fas-Antikörper gerichtete Sekundärantikörper identifiziert werden.
10. 10. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels mit ge steigerter pharmazeutischer Wirksamkeit zur Behandlung von humanen oder tierischen Erkrankungen mit erhöhten extrazellulären FasL-Titern, dadurch gekennzeichnet, daß
- 15 (a) eine Zusammensetzung, insbesondere ein IVIG-Gemisch, biochemisch fraktioniert wird,
- (b) sämtliche gemäß Verfahrensschritt (a) erhaltenen Fraktionen nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 9 untersucht und deren jeweilige anti-Fas-Antikörpertiter bestimmt werden,
- 20 (c) die Fraktion oder solche Fraktionen, die anti-Fas-Antikörper enthält (enthalten), isoliert wird (werden), und
- (d) schließlich die gemäß Verfahrensschritt (c) erhaltene(n) Fraktion(en) aufkonzentriert wird (werden).
- 25 11. 11. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels mit ge steigerter pharmazeutischer Wirksamkeit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß
- (a) eine Zusammensetzung, insbesondere ein IVIG-Gemisch, biochemisch fraktioniert wird,
- 30 (b) sämtliche gemäß Verfahrensschritt (a) erhaltene Fraktionen nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 9 untersucht und deren jeweilige anti-Fas-Antikörpertiter bestimmt werden,
- (c) die Fraktion oder solche Fraktionen, die anti-Fas-Antikörper enthält (enthalten), isoliert wird (werden),
- 35 (d) anti-Fas-Antikörper in aufgereinigter Form durch Affinitätschromatographie, insbesondere durch ein säulenchromatographisches Verfahren, mittels Fas-

Fusionsprotein als auf dem Träger angekuppeltem Liganden isoliert werden, und

- (e) die gebundenen anti-Fas-Antikörper eluiert werden.

5

12. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels mit gesteigerter pharmazeutischer Wirksamkeit nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß

- (a) eine Zusammensetzung, insbesondere ein IVIG-Gemisch, biochemisch fraktioniert wird,
- (b) sämtliche gemäß Verfahrensschritt (a) erhaltenen Fraktionen nach einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 9 untersucht und deren anti-Fas-Antikörpertiter bestimmt werden,
- (c) die Fraktion oder solche Fraktionen, die anti-Fas-Antikörper enthält (enthalten), isoliert wird (werden),
- (d) anti-Fas-Antikörper in aufgereinigter Form durch Affinitätschromatographie, insbesondere durch ein säulenchromatographisches Verfahren, mittels Fas-Fusionsprotein als auf dem Träger angekuppeltem Liganden isoliert werden,
- (e) die gebundenen anti-Fas-Antikörper eluiert werden,
- (f) aus dem Eluat epitopspezifische anti-Fas-Antikörper isoliert werden, indem jeweils ein oder mehrere spezifische(s) Epitop(e), die jeweils Aminosäuresequenzen auf dem Fas-Protein entsprechen, auf dem Trägermaterial der chromatographischen Säule(n) angekuppelt werden und nachfolgend das gemäß Verfahrensschritt (e) erhaltene Eluat ein- oder mehrfach die Säule(n) passiert,
- (g) schließlich die gebundenen anti-Fas-Antikörper eluiert werden.

10

15

20

25

30

35

13. Verwendung eines Verfahrensprodukts, erhalten aus einem der Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von humanen oder tierischen Erkrankungen mit pathophysio-

logisch erhöhten extrazellulären FasL-Titern, insbesondere zur Behandlung von toxischer epidermaler Ne-
krolyse, graft-versus-host disease, Hepatitis, fulmi-
nanter Hepatitis, Autoimmunthyroiditis, malignen Tu-
morerkrankungen oder HIV.

Fig. 1

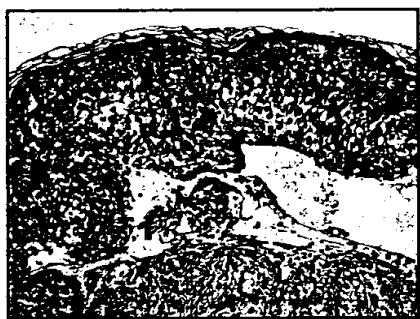


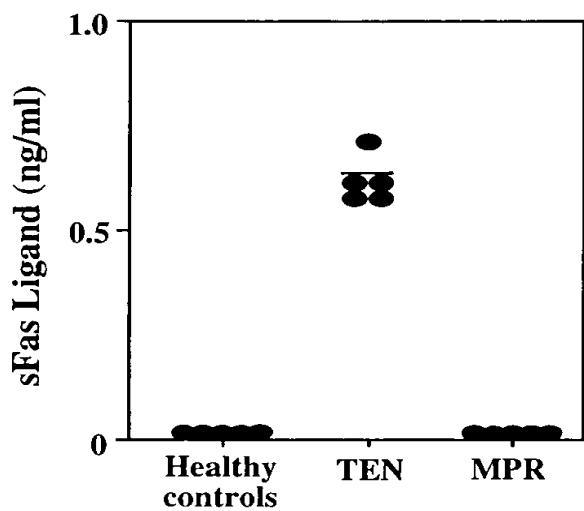
Fig. 2

Fig. 3



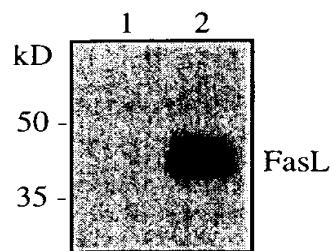
Fig. 4

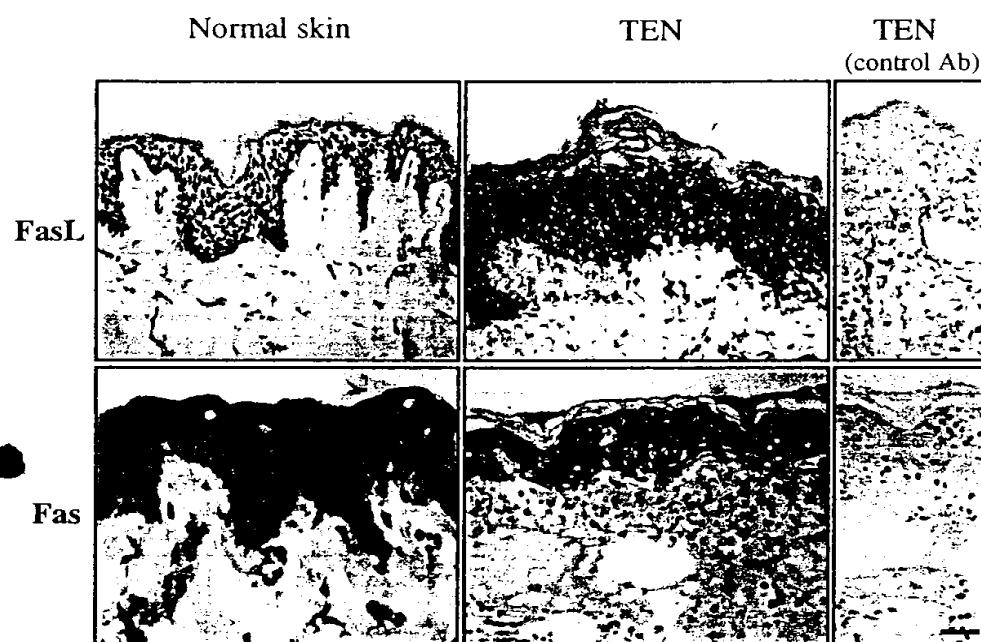
Fig. 5

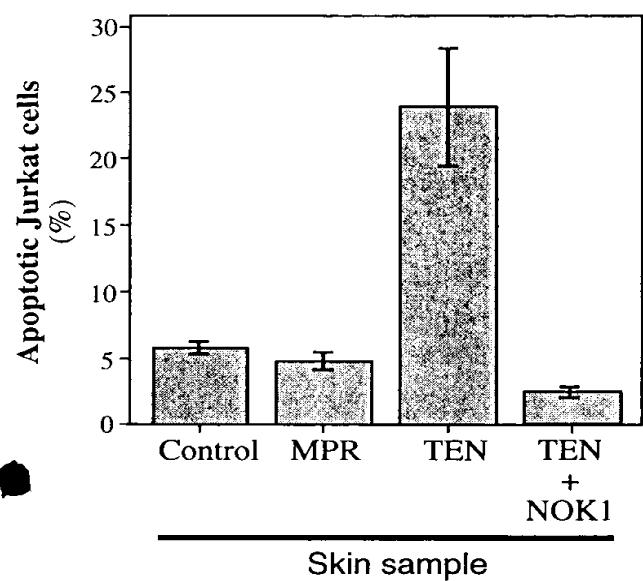
Fig. 6

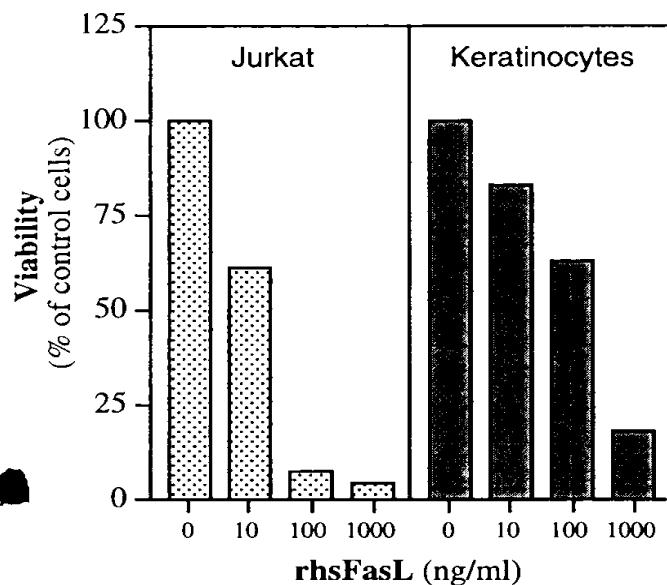
Fig. 7

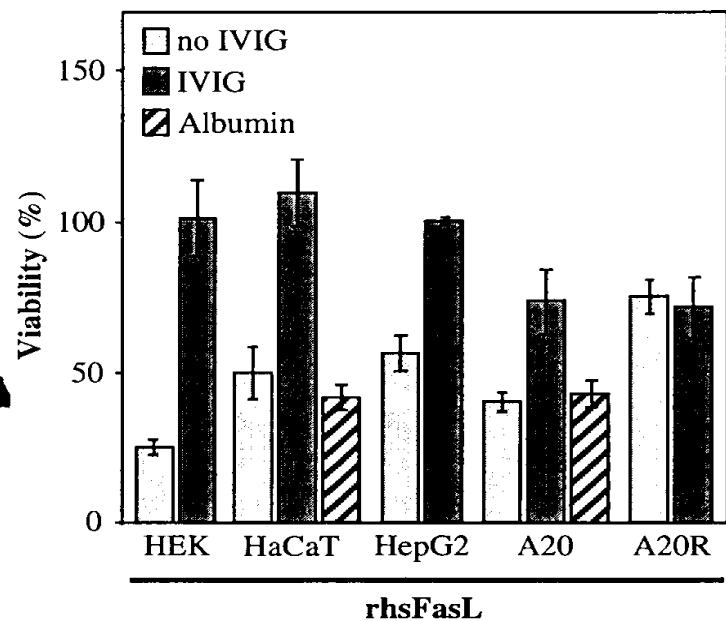
Fig. 8

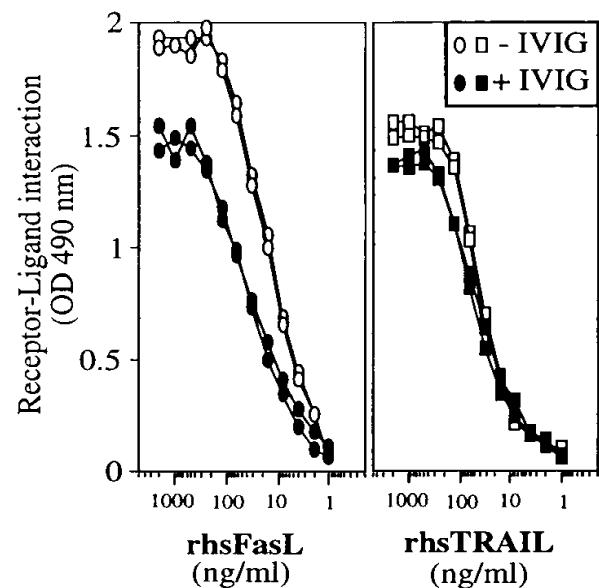
Fig. 9

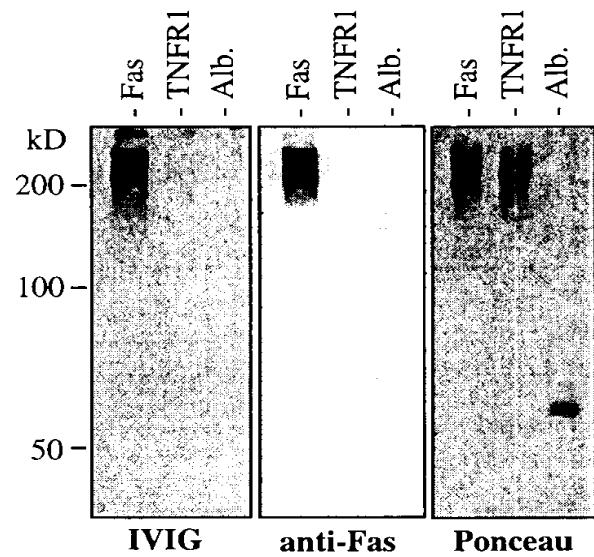
Fig. 10

Fig. 11